

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003年9月12日 (12.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/074564 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07K 14/80, 7/06, 7/08, 1/12, 1/16,  
A61K 38/17, A61P 3/00, 7/00, 9/00, 43/00

東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人  
日本大学内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/02394

(74) 代理人: 川俣 静子 (KAWAMATA, Shizuko); 〒271-0092  
千葉県松戸市松戸2156MH2ビル405 実川・  
川俣特許事務所 Chiba (JP).

(22) 国際出願日: 2003年2月28日 (28.02.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,  
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ,  
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,  
ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-058086 2002年3月4日 (04.03.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人  
日本大学 (NIHON UNIVERSITY SCHOOL JURIDI-  
CAL PERSON) [JP/JP]; 〒102-8275 東京都千代田区  
九段南四丁目8番24号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI  
特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 奥 忠武  
(OKU, Tadatake) [JP/JP]; 〒102-8275 東京都千代田  
区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内  
Tokyo (JP). 西尾 俊幸 (NISHIO, Toshiyuki) [JP/JP];  
〒102-8275 東京都千代田区九段南四丁目8番  
24号 学校法人日本大学内 Tokyo (JP). 河内 隆  
(KAWACHI, Ryu) [JP/JP]; 〒102-8275 東京都千代田区  
九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内 Tokyo  
(JP). 駿河 康平 (SURUGA, Kohei) [JP/JP]; 〒102-8275

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL HEMEPEPTIDE

(54) 発明の名称: 新規ヘムペプチド

(57) Abstract: A novel hemepeptide and a process for producing the same. Namely, it is intended to provide a peptide having a potent ability to capture NO which is usable in capturing and quantifying NO and available as a diagnostic, preventive or remedy for diseases in which NO participates, a laboratory reagent, a reagent for measuring environmental NO concentration and a treatment agent for eliminating environmental NO.

(57) 要約: 新規ヘムペプチド及びその製造方法である。NOの捕捉・定量に使用可能で、NOが関与する疾病の診断剤、予防剤もしくは治療剤として、研究試薬として、環境中のNO濃度の測定に用いる試薬として、環境中のNOの除去に使用される処理剤として使用することのできる、NO捕捉力の強いペプチドが提供される。

WO 03/074564 A1

## 明 細 書

## 新規ヘムペプチド

## 技術分野

本発明は、新規ヘムペプチド、特にNO捕捉能を有するヘムペプチド、該ヘムペプチドの製造方法、並びに該ヘムペプチドを含むNO捕捉剤及び医薬組成物に関する。

## 背景技術

近年、糖尿病、動脈硬化、癌等の生活習慣病への一酸化窒素（NO）の関与が報告されている。即ち、NOの生産異常が多くの生理機能や病気に関与していることが報告されている。例えば、NOの不足が、高血圧、高脂血症、動脈硬化、心不全、冠動脈攣縮等に関与しており、NOの過多が脳卒中、ハンチントン病、パーキンソン病等に関与していることが知られている。

また、NOは、環境汚染物質NO<sub>x</sub>の一つでもあり、NOを捕捉する物質の開発は、環境汚染の測定において、また汚染された大気、水等の浄化においても重要である。

従って、NOの定量や捕捉物質の開発が望まれていた。

しかしながら、NOは常温でガス体であり、不安定であるため、取扱いや定量が困難であり、有効なNO捕捉物質も知られていなかった。

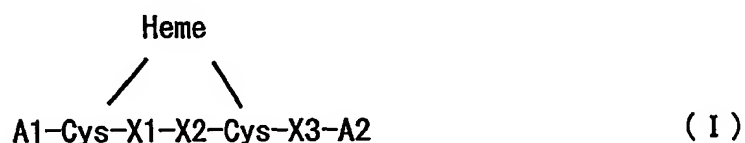
本発明者らは、これまでにシトクロムcがNO捕捉能を有することを見出している（化学と生物34(12), 784-785(1996)）。また、同様のC-typeシトクロムを紅藻スサビノリ、緑藻クロレラ、光合成細菌など各種生物から単離し、NO捕捉能を確認している（Biosci. Biotechnol. Biochem., 64(3), 628-632, 2000, Jap. J. Pharmacol., 75(Suppl. I), 113 P(1997)）。さらに、本発明者らは、紅藻スサビノリ *Porphyra yezoensis* 由来のシトクロムcのX線立体構造解析により

三次構造を決定しており (Acta Cryst., D56, 1577-1582(2000))、またシトクロム c の組換え大腸菌での発現系を構築している。

本発明者らは、NO 捕捉能を有する物質についてさらに研究を進め、シトクロム c に比べてさらに高い NO 捕捉能を有するヘムペプチドを見出した。

#### 発明の開示

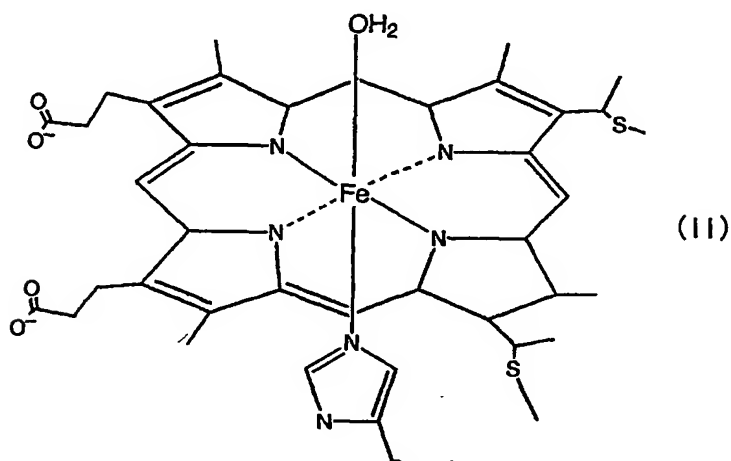
本発明は下記式 I で表されるヘムペプチドに関する。



(式中、A1は水素原子または 1～20 個、好ましくは 1～10 個、特に 1～5 個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖を表し、

A2は水酸基または 1～50 個、好ましくは 1～10 個、特に 1～5 個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖を表し、

Hemeは次式：



で表されるヘム核を表し、

X1, X2は各々独立に任意のアミノ酸残基を表し、

X3は、His LysまたはArgを表す。）

上記ヘム核は、3, 8位のシステイニルチオエーテル結合を介してシステイン残基に結合することができる。

(2) X1及びX2が各々独立にAla、Gln、Lys、Arg及びValからなる群より選択されるアミノ酸残基を表す(1)のヘムペプチド。

(3) X1がAlaであり、X2がGlnまたはAlaであり、X3がHisである(1)のヘムペプチド。

(4) A1が、水素原子またはアミノ酸配列Val Gln Lysを有するペプチド鎖であり、

A2がアミノ酸配列Thr Val Glu Lysまたはアミノ酸配列Thr Val Glu Lys Gly Gly Lys His Lys Thr Gly Pro Asn Leuを有するペプチド鎖であり、

X1がAlaであり、X2がGlnであり、X3がHisである(1)のヘムペプチド。

(5) A1がアミノ酸配列Phe Ser Ala Asnを有するペプチド鎖であり、

A2がアミノ酸配列Ala Gly Gly Asn Asn Alaを有するペプチド鎖であり、

X1がAlaであり、X2がAlaであり、X3がHisである(1)のヘムペプチド。

また、本発明は、シトクロムcを制限酵素で消化し、所望により塩析処理を行った後、ゲル濾過クロマトグラフィーで精製することからなる(1)～(5)のヘムペプチドの製造方法に関する。制限酵素は、好ましくはサーモライシン、トリプシン、キモトリプシン、AchromobacterプロテアーゼI及びStaphylococcus aureus V8プロテアーゼからなる群から選択される。

さらに、本発明は、(1)～(5)のヘムペプチドを含むNO捕捉剤に関する。

本発明の上記ペプチドは、特に、シトクロムcの少なくとも14番目のCysから18番目のアミノ酸までのアミノ酸配列、または該配列において15番目、16番目及び18番目のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を有するペプチドを含み、ヘム核が14番目のCysと17番目のCysに3, 8位のシステイニルチオエーテル結合を介して結合しており、18番目のアミノ酸残基がHis、LysまたはArgであり、15番目及び16番目のアミノ酸が好ましくはAla、Gln、Lys、Argまたは

Valであり、14番目のCysのN末端側のペプチド鎖と17番目のCysのC末端側のペプチド鎖が好ましくは50塩基以下、より好ましくは10塩基以下であることを特徴とするものである。このようなヘムペプチドがシトクロムcよりも高いNO捕捉能を有することは、本発明者の鋭意研究により見出されたものであるが、これは、おそらく分子が小さくなることにより単位面積あたりの溶媒分子数が増大することに加えて、ヘム核が溶媒面に露出してNOとの衝突確率が高まったためであると考えられる。

#### 発明を実施するための最良の形態

A1の具体例としては、例えば、配列表の配列番号1（ウマ心筋シトクロムcの配列）または配列番号2（紅藻スサビノリのシトクロムc<sub>6</sub>の配列）のアミノ酸番号1～13のアミノ酸配列またはそれらの1～数個のアミノ酸が置換、欠失または付加されたアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号13からN末端側に連続する1～13個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖が挙げられる。

A2の具体例としては、例えば、配列表の配列番号1（ウマ心筋シトクロムcの配列）または配列番号2（紅藻スサビノリのシトクロムc<sub>6</sub>の配列）のアミノ酸番号19～70のアミノ酸配列またはそれらにおいて1～数個のアミノ酸が置換、欠失または付加されたアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号19のアミノ酸からC末端側に連続する1～50個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖が挙げられる。

本明細書において「NO捕捉剤」は、NOの捕捉に用いられるものであれば、目的を問わない。典型的には、生体内、例えば血中のNO濃度の測定のための診断剤、生体内、例えば血中のNOの捕捉するNOの過多に関連する疾病の予防剤・治療剤、研究用試薬、大気中、排気ガス中、または水中のNO濃度の測定のための試薬、また水処理または排気ガス処理のための処理剤として使用されるものである。

本発明のヘムペプチドは、シトクロムcのアミノ酸配列をコードする塩基配列

を有するDNA、またはこれに部位特異的変異を導入したDNAを含むベクターを宿主細胞に導入し、該宿主細胞を培養し、培養物からシトクロムcを単離し、これを制限酵素で消化した後、クロマトグラフィー等の方法により精製することにより製造することもできる。この場合、形質転換に用いるベクターとしては、バイオテクノロジーの分野で慣用のプラスミド、ファージ等を使用することができる。宿主細胞は、好ましくは原核生物の細胞、より好ましくは細菌、特に大腸菌である。シトクロムcの単離は、例えば培養細胞を採取し、物理的に破碎し、抽出し、精製することにより行うことができる。培養細胞の採取は、固体培地の場合は培養細胞をかきとることにより、また液体培地の場合には遠心分離により行うことができる。

なお、本発明において、「シトクロムc」は、シトクロムc<sub>1</sub>、シトクロムc<sub>2</sub>、シトクロムc<sub>6</sub>、シトクロムc-551等、全てのc型シトクロムを含む。

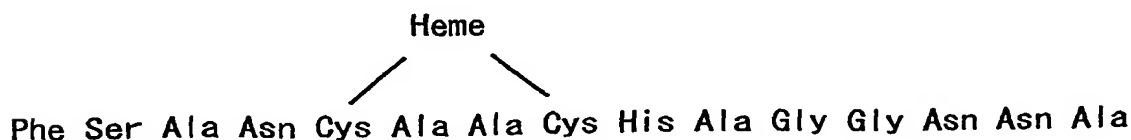
また、本発明のペプチドを構成する「アミノ酸残基」には、修飾されたアミノ酸残基も含まれる。

#### 実施例

以下の実施例において、試薬は特記しない限り、和光純薬製のものを使用した。等電点は、Ampholine PAGplateゲル (Pharmacia社製、IEF用、pH3.5-9.5) を用いた等電点電気泳動により解析した。吸収極大は、HITACHI U-3310spectrophotometer (HITACHI社製) を用いて測定した。酸化還元電位は、HITACHI U-3310spectrophotometer (HITACHI社製)、ORP電極 (Metrohm社製) を用いて測定した。

#### 実施例1：ヘムペプチド (mp 15) の調製

下記のアミノ酸配列を有するヘムペプチドを調製した。



(配列番号3の配列を有するペプチドの5番目及び8番目のシステインに前記式

IIのヘム核が結合したもの)

紅藻スサビノリ (*Porphyra yezonesis*) より精製したシトクロム c、1 mg を 0.1 M トリスー塩酸緩衝液 pH 7.8 (2 mM 塩化カルシウムを含む) 200  $\mu$  l に溶解した。得られたシトクロム c 溶液を 37°C で 5 分間保温し、これに 0.1 M トリス塩酸緩衝液に溶解した 1 mg / ml サーマライシン溶液 62.5  $\mu$  l を添加し、さらに上記と同じ緩衝液 37.5  $\mu$  l を添加した。この反応溶液を、37°C で 4.5 時間保温した。この反応溶液を氷冷して反応を停止させた後、上記と同じ緩衝液 700  $\mu$  l を加えた。得られた反応溶液をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Toyopearl HW-40F, 1.0 x 80cm, 東ソー社製) で精製し、標記のペプチドを得た。得られたペプチドを電気泳動にかけ、単一物質であることを確認した。また、このペプチドのアミノ酸配列をアミノ酸シーケンサーで調べ、標記の配列を有するペプチドであることを確認した。

また、得られたペプチドは、下記の物理学的性質を有していた：

等電点：4.15，酸化型の吸収極大：404, 526nm，還元型の吸収極大：413.5, 549.5nm，酸化還元電位-82.2mV，分子量：2200。

実施例 2：ヘムペプチド (mp 9) の調製

下記のアミノ酸配列を有するペプチドを調製した。



(配列番号 4 の配列を有するペプチドの 1 番目及び 4 番目のシステインに前記式 II のヘム核が結合したもの)

ウマ心筋シトクロム c (和光純薬社製) 1 mg を 0.1 M トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.0) 100  $\mu$  l に溶解した。得られたシトクロム c 溶液を 37°C で 5 分間保温し、これに 0.1 M トリス塩酸緩衝液に溶解した 1 mg / ml トリプシン溶液 40  $\mu$  l を添加し、さらに上記と同じ緩衝液 60  $\mu$  l を添加した。この反

応溶液は、37℃で24時間保温した。この反応溶液を氷冷して反応を停止させた後、硫酸アンモニウム78mgを添加した後、沈殿物を濾取し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Toyopearl HW-40F, 1.0 x 80cm, 東ソー社製) で精製し、標記のペプチドを調製した。得られたペプチドを電気泳動にかけ、単一物質であることを確認した。また、このペプチドのアミノ酸配列をアミノ酸シーケンサーで調べ、標記の配列を有するペプチドであることを確認した。

また、得られたペプチドは、下記の物理学的性質を有していた：

等電点：4.95, 酸化型の吸収極大：395, 619nm, 還元型の吸収極大：412, 520, 549nm, 酸化還元電位-132mV, 分子量：1637。

### 実施例3：ヘムペプチド (mp 22) の調製

下記のアミノ酸配列を有するペプチドを調製した。



(配列番号5の配列を有するペプチドの4番目及び7番目のシステインに前記式IIのヘム核が結合したもの)

ウマ心筋シトクロムc (和光純薬社製) 1mgを0.1Mトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 100μlに溶解した。得られたシトクロムc溶液を37℃で5分間保温し、これに0.1Mトリス塩酸緩衝液に溶解した1mg/mlキモトリプシン溶液40μlを添加し、さらに上記と同じ緩衝液60μlを添加した。この反応溶液は、37℃で24時間保温した。この反応溶液を氷冷して反応を停止させた後、硫酸アンモニウム78mgを添加した後、沈殿物を濾取し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Toyopearl HW-40F, 1.0 x 80cm, 東ソー社製) で精製し、標記のペプチドを調製した。得られたペプチドをHPLCにかけ、単一物質であることを確認した。また、このペプチドのアミノ酸配列をアミノ酸シーケ



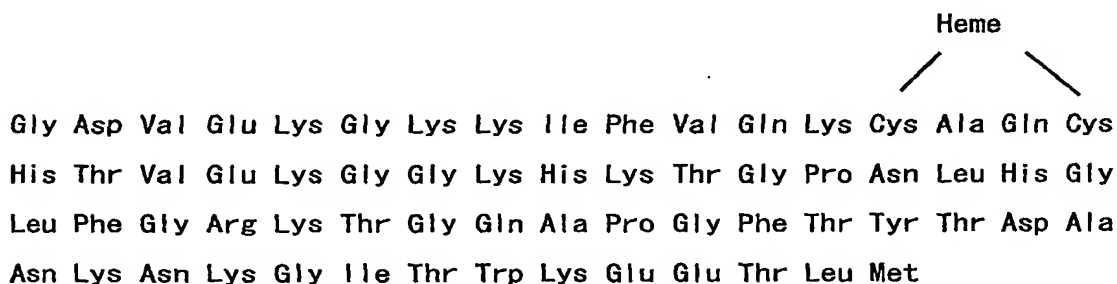
ンサーで調べ、標記の配列を有するペプチドであることを確認した。

また、得られたペプチドは、下記の物理学的性質を有していた：

等電点：6.02，酸化型の吸収極大：398，620nm，還元型の吸収極大：416，520，549nm，酸化還元電位-66.5mV，分子量3065。

#### 実施例4：ヘムペプチド（mp 65）の調製

下記のアミノ酸配列を有するペプチドを調製した。



（配列番号6の配列を有するペプチドの14番目及び17番目のシステインに前記式IIのヘム核が結合したもの）

ウマ心筋シトクロムc（和光純薬社製）1mgを10mg/ml臭化シアン（70%ギ酸に溶解したもの）100μlに溶解し、反応チューブ内を窒素通気した。得られたシトクロムc溶液を20℃で24時間保温した。この反応溶液を水冷して反応を停止させた後、超純水400μlを加え、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー（Toyopearl HW-40F，1.0 x 80cm，東ソー社製）で精製し、標記のペプチドを調製した。得られたペプチドを電気泳動にかけ、単一物質であることを確認した。また、このペプチドのアミノ酸配列をアミノ酸シーケンサーで調べ、標記の配列を有するペプチドであることを確認した。

また、得られたペプチドは、下記の物理学的性質を有していた：

等電点：9.52，酸化型の吸収極大：404，535nm，還元型の吸収極大：415，520，549nm，酸化還元電位-62.1mV，分子量8900。

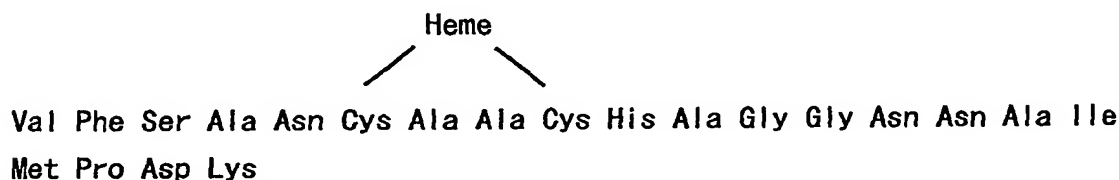
実施例5：制限酵素として、キモトリプシンの代わりにAchromobacterプロテアーゼI（リシルエンドペプチダーゼ）を使用すること以外は、実施例3と同様の

方法により、下記式で表されるNO捕捉ヘムペプチドを調製した。



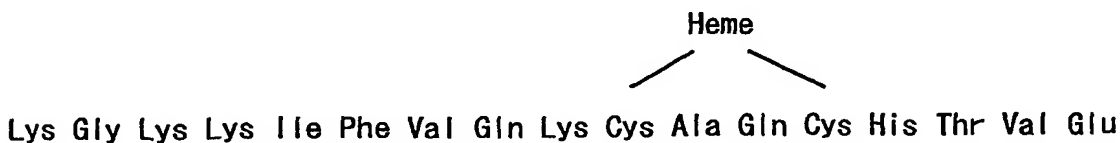
(配列番号7の配列を有するペプチドの1番目及び4番目のシステインに前記式IIのヘム核が結合したもの)

実施例6：制限酵素として、サーモライシンの代わりにAchromobacterプロテアーゼI（リシルエンドペプチダーゼ）を使用すること以外は、実施例1と同様の方法により、下記式で表されるNO捕捉ヘムペプチドを調製した。



(配列番号8の配列を有するペプチドの6番目及び9番目のシステインに前記式IIのヘム核が結合したもの)

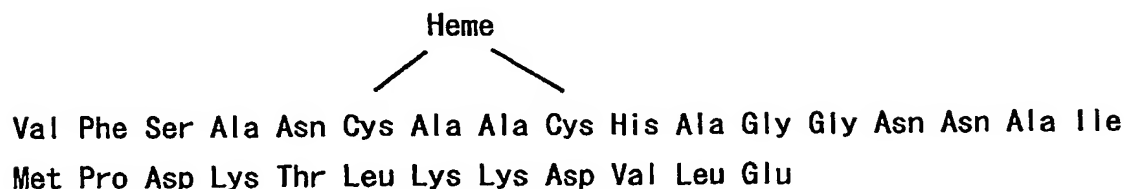
実施例7：制限酵素として、キモトリプシンの代わりにStaphylococcus aureus V8プロテアーゼ（エンドプロテナーゼGlu-C）を使用し、リン酸緩衝液の代わりにアンモニウム系緩衝液を使用すること以外は、実施例3と同様の方法により、下記式で表されるNO捕捉ヘムペプチドを調製した。



(配列番号9の配列を有するペプチドの10番目及び13番目のシステインに前記式IIのヘム核が結合したもの)

実施例8：制限酵素として、サーモライシンの代わりにStaphylococcus aureus

V8プロテアーゼ（エンドプロテナーゼGlu-C）を使用し、リン酸緩衝液の代わりにアンモニウム系緩衝液を使用すること以外は、実施例1と同様の方法により、下記式で表されるNO捕捉ヘムペプチドを調製した。



（配列番号10の配列を有するペプチドの6番目及び9番目のシステインに前記式IIのヘム核が結合したもの）

#### 試験例1：NO捕捉能の測定

10mlのバイアルに、100mMリン酸緩衝液（pH7.0）0.3ml、10mM亜硝酸ナトリウム0.4ml、上記各ペプチド溶液0.5ml、3mMメチルビオロゲン（東京化成工業株式会社製）0.4mlを入れ、ブチルゴム栓とアルミシールで密封した。このバイアルを、アルゴンを通気しながら37℃で5分間保温した後、100mM亜ジチオン酸ナトリウム（50mM炭酸水素ナトリウムに溶解したもの）0.3mlを添加することにより、反応を開始した。一定の時間間隔で反応液を0.2mlずつ分取し、ボルテックスミキサーで空気酸化させることにより反応を停止した。

残存亜硝酸量をジアゾ化法により測定した。反応液を0.02mlとり、超純水を1.98ml添加した後、1%スルファニルアミド1ml、0.02%のN-1-ナフチルエチレンジアミン塩酸塩1ml、超純水1mlを添加し、室温で20分間放置した後、生成アゾ色素の540nmにおける吸光度を測定し、既知濃度の亜硝酸溶液から作製した検量線より、残存亜硝酸量を算出した。

測定は、SHIMADZU UV-1600 UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETERを用いて行った。

反応速度論的解析は、2, 4, 6, 8, 10mM亜硝酸ナトリウムに対する比活性を求め、その後Lineweaver-Burkプロットにより反応回転数 $k_{cat}$  ( $s^{-1}$ ) を算

出することにより行った。

各実施例で得られたペプチドの反応速度定数を下記の表に示す。

また、比較のためにウマ心筋シトクロム c 及び紅藻スサビノリシトクロム c<sub>o</sub> の反応速度定数を併記した。

表 1

ペプチド		反応速度定数 $k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )
実施例 1	mp 1 5	2. 5 4
実施例 2	mp 9	1. 6 6
実施例 3	mp 2 2	0. 8 0
実施例 4	mp 6 5	0. 1 2
比較例 1	ウマ心筋シトクロム c	$15. 21 \times 10^{-3}$
比較例 2	紅藻スサビノリシトクロム c <sub>o</sub>	0. 0 5

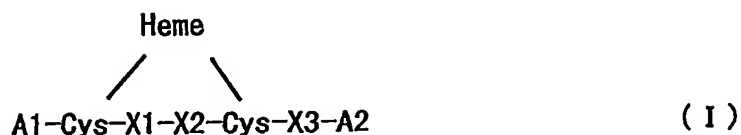
表より、本発明のヘムペプチドが、シトクロム c と比較して、著しく高い NO 捕捉能を有することが明らかである。

#### 産業上の利用可能性

生体内での NO の定量のための試薬、生体内で NO を制御する医薬品組成物、環境中の NO 濃度を測定するための試薬、汚染大気や汚染排水の浄化剤として利用可能な NO 捕捉剤が提供される。さらに、本発明のヘムペプチドのうち、水溶性のものは、液体試料中での用途に適している。

## 請求の範囲

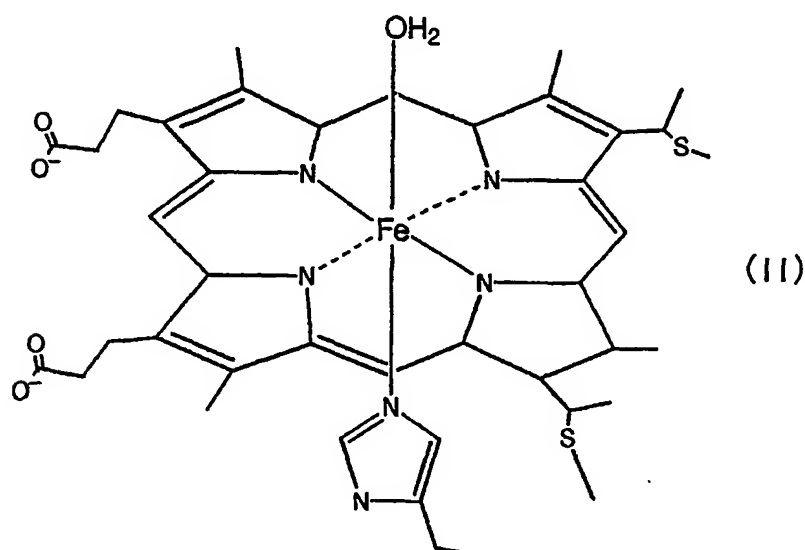
1. 次式 I で表されるヘムペプチド。



(式中、A1は水素原子または1～20個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖を表し、

A2は水酸基または1～50個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖を表し、

Hemeは次式：



で表されるヘム核を表し、

X1, X2は各々独立に任意のアミノ酸残基を表し、

X3は、His LysまたはArgを表す。)

2. 上記式 I 中、X1及びX2が各々独立にAla、Gln、Lys、Arg及びValからなる群より選択されるアミノ酸残基を表す請求の範囲第1項記載のヘムペプチド。

3. 上記式 I 中、X1がAlaであり、X2がGlnまたはAlaであり、X3がHisである請求の範囲第1項記載のヘムペプチド。

4. 上記式 I 中、A1が、水素原子またはアミノ酸配列Val Gln Lysを有するペプチド鎖であり、

A2がアミノ酸配列Thr Val Glu Lysまたはアミノ酸配列Thr Val Glu Lys Gly Gly Lys His Lys Thr Gly Pro Asn Leuを有するペプチド鎖であり、

X1がAlaであり、X2がGlnであり、X3がHisである請求の範囲第 1 項記載のヘムペプチド。

5. 上記式 I 中、A1がアミノ酸配列Phe Ser Ala Asnを有するペプチド鎖であり、

A2がアミノ酸配列Ala Gly Gly Asn Asn Alaを有するペプチド鎖であり、

X1がAlaであり、X2がAlaであり、X3がHisである請求の範囲第 1 項記載のヘムペプチド。

6. シトクロム c を制限酵素で消化し、ゲル濾過クロマトグラフィーで精製することからなる請求の範囲第 1 項記載のヘムペプチドの製造方法。

7. 前記制限酵素が、サーモライシン、トリプシン、キモトリプシン、AchromobacterプロテアーゼI及びStaphylococcus aureus V8プロテアーゼからなる群から選択される請求の範囲第 6 項記載の方法。

8. シトクロム c を制限酵素で消化し、ゲル濾過クロマトグラフィーで精製することからなる請求の範囲第 2 項記載のヘムペプチドの製造方法。

9. 前記制限酵素が、サーモライシン、トリプシン、キモトリプシン、AchromobacterプロテアーゼI及びStaphylococcus aureus V8プロテアーゼからなる群から選択される請求の範囲第 8 項記載の方法。

10. シトクロム c を制限酵素で消化し、ゲル濾過クロマトグラフィーで精製することからなる請求の範囲第 3 項記載のヘムペプチドの製造方法。

11. 前記制限酵素が、サーモライシン、トリプシン、キモトリプシン、AchromobacterプロテアーゼI及びStaphylococcus aureus V8プロテアーゼからなる群から選択される請求の範囲第 10 項記載の方法。

12. シトクロム c を制限酵素で消化し、ゲル濾過クロマトグラフィーで精製することからなる請求の範囲第 4 項記載のヘムペプチドの製造方法。

13. 前記制限酵素が、サーモライシン、トリプシン、キモトリプシン、*Achromobacter* プロテアーゼ I 及び *Staphylococcus aureus* V8 プロテアーゼ からの群から選択される請求の範囲第 12 項記載の方法。

14. シトクロム c を制限酵素で消化し、ゲル濾過クロマトグラフィーで精製することからなる請求の範囲第 5 項記載のヘムペプチドの製造方法。

15. 前記制限酵素が、サーモライシン、トリプシン、キモトリプシン、*Achromobacter* プロテアーゼ I 及び *Staphylococcus aureus* V8 プロテアーゼ からの群から選択される請求の範囲第 14 項記載の方法。

16. 請求の範囲第 1 項記載のヘムペプチドを含む NO 捕捉剤。

17. 請求の範囲第 2 項記載のヘムペプチドを含む NO 捕捉剤。

18. 請求の範囲第 3 項記載のヘムペプチドを含む NO 捕捉剤。

19. 請求の範囲第 4 項記載のヘムペプチドを含む NO 捕捉剤。

20. 請求の範囲第 5 項記載のヘムペプチドを含む NO 捕捉剤。

## SEQUENCE LISTING

<110> NIHON UNIVERSITY JURIDICAL PERSON

<120> Novel Heme peptide

<130> PANU013

<160> 10

<210> 1

<211> 104

<212> PRT

<213> Horse

<400> 1

Gly Asp Val Glu Lys Gly Lys Lys Ile Phe Val Gln Lys Cys Ala Gln

1 5 10 15

Cys His Thr Val Glu Lys Gly Gly Lys His Lys Thr Gly Pro Asn Leu

20 25 30

His Gly Leu Phe Gly Arg Lys Thr Gly Gln Ala Pro Gly Phe Thr Tyr

35 40 45

Thr Asp Ala Asn Lys Asn Lys Gly Ile Thr Trp Lys Glu Glu Thr Leu

50 55 60

Met Glu Tyr Leu Glu Asn Pro Lys Lys Tyr Ile Pro Gly Thr Lys Met

65 70 75 80

Ile Phe Ala Gly Ile Lys Lys Lys Thr Glu Arg Glu Asp Leu Ile Ala

85 90 95



Tyr Leu Lys Lys Ala Thr Asn Glu

100

<210> 2

<211> 85

<212> PRT

<213> *Porphyra yezoensis*

<400> 2

Ala Asp Leu Asp Asn Gly Glu Lys Val Phe Ser Ala Asn Cys Ala Ala

1

5

10

15

Cys His Ala Gly Gly Asn Asn Ala Ile Met Pro Asp Lys Thr Leu Lys

20

25

30

Lys Asp Val Leu Glu Ala Asn Ser Met Asn Thr Ile Asp Ala Ile Thr

35

40

45

Tyr Gln Val Gln Asn Gly Lys Asn Ala Met Pro Ala Phe Gly Gly Arg

50

55

60

Leu Val Asp Glu Asp Ile Glu Asp Ala Ala Asn Tyr Val Leu Ser Gln

65

70

75

80

Ser Glu Lys Gly Trp

85

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Porphyra yezoensis

<400> 3

Phe Ser Ala Asn Cys Ala Ala Cys His Ala Gly Gly Asn Asn Ala

1 5 10 15

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Horse

<400> 4

Cys Ala Gln Cys His Thr Val Glu Lys

1 5

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> Horse

<400> 5

Val Gln Lys Cys Ala Gln Cys His Thr Val Glu Lys Gly Gly Lys His

1 5 10 15

Lys Thr Gly Pro Asn Leu

20

<210> 6

<211> 65

<212> PRT

<213> Horse

<400> 6

Gly Asp Val Glu Lys Gly Lys Lys Ile Phe Val Gln Lys Cys Ala Gln

1

5

10

15

Cys His Thr Val Glu Lys Gly Gly Lys His Lys Thr Gly Pro Asn Leu

20

25

30

His Gly Leu Phe Gly Arg Lys Thr Gly Gln Ala Pro Gly Phe Thr Tyr

35

40

45

Thr Asp Ala Asn Lys Asn Lys Gly Ile Thr Trp Lys Glu Glu Thr Leu

50

55

60

Met

65

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Horse

<400> 7

Cys Ala Gln Cys His Thr Val Glu Lys

1

5

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> Porphyra yezoensis

<400> 8

Val Phe Ser Ala Asn Cys Ala Ala Cys His Ala Gly Gly Asn Asn Ala

1

5

10

15

Ile Met Pro Asp Lys

20

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Horse

<400> 9

Lys Gly Lys Lys Ile Phe Val Gln Lys Cys Ala Gln Cys His Thr Val

1

5

10

15

Glu

<210> 10

<211> 29

<212> PRT

<213> Porphyra yezoensis

<400> 10

Val Phe Ser Ala Asn Cys Ala Ala Cys His Ala Gly Gly Asn Asn Ala

1

5

10

15

Ile Met Pro Asp Lys Thr Leu Lys Lys Asp Val Leu Glu

20

25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/JP03/02394

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/80, 7/06, 7/08, 1/12, 1/16, A61K38/17, A61P3/00,  
7/00, 9/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/80, 7/06, 7/08, 1/12, 1/16, A61K38/17, A61P3/00,  
7/00, 9/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	Samya Othman et al., "Resonance Raman investigation of lysine and N-acetylmethionine complexes of ferric and ferrous microperoxidase", European Biophysics Journal, 1999, Vol.28(1), pages 12 to 25, full text	<u>1-3</u> 1-20
<u>X</u> Y	Jinn-Shyan Wang et al., "Temperature-and pH-dependent Changes in the Coordination Sphere of the Heme c Group in the Model Peroxidase N-Acetyl Microperoxidase-8", The Journal of Biological Chemistry, 1992, Vol.267(22), pages 15310 to 15318, full text	<u>1-3</u> 1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 03 June, 2003 (03.06.03)	Date of mailing of the international search report 17 June, 2003 (17.06.03)
---	--

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**International Application No.**

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K14/80, 7/06, 7/08, 1/12, 1/16, A61K38/17, A61P3/00, 7/00, 9/00, 43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K14/80, 7/06, 7/08, 1/12, 1/16, A61K38/17, A61P3/00, 7/00, 9/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq,  
CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> <u>Y</u>	Samya Othman et al. "Resonance Raman investigation of lysine and N-acetylmethionine complexes of ferric and ferrous microperoxidase European Biophysics Journal, 1999, Vol.28(1), p.12-25, 文献全体参照	<u>1-3</u> <u>1-20</u>
<u>X</u> <u>Y</u>	Jinn-Shyan Wang et al. "Temperature- and pH-dependent Changes in the Coordination Sphere of the Heme c Group in the Model Peroxidase N-Acetyl Microperoxidase-8" The Journal of Biological Chemistry, 1992, Vol.267(22), p.15310-15318, 文献全体参照	<u>1-3</u> <u>1-20</u>

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.06.03

国際調査報告の発送日

17.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

4N

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	SHyamalava Mazumdar et al. "Stability and Characterization of Iron(III) and Iron(II) Heme Peptides Encapsulated in Aqueous Detergent Micelles: <sup>1</sup> H NMR and UV-Vis Spectroscopic Studies" Inorganic Chemistry, 1991, Vol. 30(4), p. 700-705, 文献全体、特にFig1参照	1-20
Y	Richard E. Dickerson et al. "Ferricytochrome c" The Journal of Biological Chemistry, 1971, Vol. 246(5), p. 1511-1535, 文献全体、特にFig. 1及びAPPENDIX参照	1-20
Y	Seiji Yamada et al. "Structure of cytochrome c <sub>s</sub> from the red alga <i>Porphyra yezoensis</i> at 1.57 Å resolution" Acta Crystallographica Section D: Biological Crystals, 2000, Vol. D56(12), p. 1577-1582, 文献全体、特にFigure4参照	1-20
Y	"一酸化窒素(NO)のヘムタンパク質による捕捉" 化学と生物, 1996, Vol. 34(12), p. 784-785, 文献全体参照	16-20
Y	Seiji Yamada et al. "Characterization and Amino Acid Sequences of Cytochromes c <sub>s</sub> from Two Strains of the Green Alga <i>Chlorella vulgaris</i> " Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2000, Vol. 64(3), p. 628-632, 文献全体参照	16-20